Cancer Research and Treatment 2001;33(6):500-511

Evaluation of E1B-mutant Replicating Adenoviruses for Cancer Gene Therapy

Jaesung Kim[1], **Joo-Hang Kim**, M.D.[1], **Heuiran Lee**, Ph.D.[1], **Kyeong-Cheon Jung**, Ph.D.[2] and **Chae-Ok Yun**, Ph.D.[1]

[1]Institute of Cancer Research, Yonsei Cancer Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea; [2]Department of Pathology, Hallym University College of Medicine, Chuncheon, Korea

Purpose: **Gene-attenuated replication-competent adenoviruses are emerging as a promising new modality for the treatment of cancer. In an effort to continually improve upon cancer gene therapy, we have modified gene-attenuated replication-competent adenoviruses so as to cause them to replicate efficiently and lyse the infected cancer cells more effectively.**

Materials and Methods: **We modified the E1 region of the adenovirus (Ad) systematically, generating Ad-ΔE1B19, Ad-ΔE1B55, Ad-ΔE1B19/55, and Ad-WT. The cytopathic effects (CPE) and viral replication of these four gene modified adenoviruses were compared, and the morphology and DNA fragmentation of the infected cells was evaluated.**

Results: **Among the constructed adenoviruses, E1B 19kD-inactivated adenovirus (Ad-ΔE1B19) was the most potent, inducing the largest-sized plaques and marked CPE. Moreover, cells infected with Ad-ΔE1B19 showed complete cell lysis with disintegrated cellular structure whereas cells infected with Ad-WT maintained intact cellular and nuclear membrane with properly structured organelles. TUNEL assay was also used to monitor DNA integrity, and a more profound induction of apoptosis was observed in the Ad-ΔE1B19 infected cells in comparison to wild type adenovirus infected cells.**

Conclusion: **We demonstrate that the inactivation of the E1B19kD gene in a replicating adenovirus leads to increased CPE, rapid viral release, improved cell-to-cell viral spread and increased induction of apoptosis.** ***(Cancer Research and Treatment 2001;33:500-511)***

Key Words: Cancer gene therapy, Replication-competent adenovirus, Apoptosis

서 론

1990년 유전자 치료가 임상적으로 처음 시도된 이후 치료용 유전자의 전달기법에 관한 연구가 활발해 졌다(1,2). 재조합 아데노바이러스를 유전자 전달체로서 이용한 유전자 전달의 가능성은 1984년 Dr. Graham에 의하여 최초로 보고되었으며(3), 이후 재조합 아데노바이러스는 우수한 유전자 전달 효율을 보이며 높은 역가로 생산이 가능하고 쉽게 농축할 수 있는 장점들이 보고되면서, 암을 대상으로 하는 유전자 치료에 재조합 아데노바이러스를 유전자 전달체로 이용하는 빈도수가 현격히 증가하고 있다. 암 유전자치료용 아데노바이러스는 대부분이 증식 불가능한 일 세대 바이러스로 이들을 유전자 전달체로 이용하는 경우 암세포 살상 효과는 일차 감염세포 또는 일부의 주변세포들에서만 유발되기 때문에 치료효과가 제한적일 수밖에 없다. 이를 극복할 수 있는 한 방안으로 McCormick 등은 아데노바이러스 초기 유전자인 E1B55kDa이 부분적으로 결실된 dl1520 (ONYX-015)을 개발하였는데, 이들은 p53 유전자가 돌연변이 되거나 결실된 종양세포에서만 선택적으로 증식하여 암세포를 특이적으로 살상할 수 있다고 보고한 바 있으며(4), 현재 이를 이용한 임상시험이 진행 중에 있다(5). 본 연구팀에서도 E1B55kDa 유전자가 돌연변이된 아데노바이러스 YKL-1을 개발하여 이들이 p53 유전자의 변형이 일어난 암세포에서만 증식하여 암세포를 선택적으로 살상 가능함을 보고한 바 있다(6,7). 하지만, YKL-1과 dl1520을 비롯한 여러 E1B55kDa 유전자가

Correspondence: Chae-Ok Yun, Institute of Cancer Research, Yonsei Cancer Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea. (Tel) 02-361-7648, 7651, (Fax) 02- 362-0158, (E-mail) chaeok@yumc.yonsei.ac.kr

This work was supported by grants from Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (HMP-01-PJ1-PG3-20800-0115, Dr. C-O. Yun) and Ministry of Commerce Industry and Energy, Republic of Korea (N03-990-5411-01-1-3, Dr. J-H. Kim). Jaesung Kim is a graduate student sponsored by Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University.

Received September 21, 2001, Accepted December 10, 2001

변형된 아데노바이러스들의 종양 특이적 살상능은 야생형 아데노바이러스보다 현격히 낮아, 임상에 효과적으로 적용하기 위해서는 이들의 세포 살상능이 개선되어져야 한다.

아데노바이러스의 초기 발현유전자인 E1B 유전자는 E1B 19kDa과 E1B55kDa으로 이루어져 있으며, 이들 중 E1B 19kDa 단백질은 강력한 세포고사(apoptosis) 억제제로서 Bcl-2와 염기서열 및 그 기능이 유사하다(8). E1B 19kDa 단백질은 아데노바이러스의 초기 발현 유전자인 E1A에 의해 유도되는 세포고사를 억제하는 물질로 잘 알려져 있으며, 여러 사람의 종양세포들에서 p53에 의하여 유도되어지는 세포고사도 억제시킨다는 결과가 보고되었다(9,10). 또한, 성장 인자의 제거나 방사선 치료, 또는 항암제에 의해 유도되는 세포고사를 억제하는 데 있어서 E1B 19kDa과 Bcl-2가 기능적으로 같은 역할을 할 수 있음이 보고된 바 있다(11). 세포사에 관한 최근의 연구들에 의하여 밝혀진 바와 같이, 여러 항암제에 의한 세포 사멸은 주로 세포고사에 의해 이루어지며, 이들에 의한 항암효과는 암세포에서의 세포고사 기작이 정상일 때만이 효과적이다. 이러한 배경 하에, cisplatin이나 paclitaxel과 같은 항암제를 세포고사를 유도할 수 있는 Bax 유전자가 삽입된 아데노바이러스와 함께 투여하여 항암효과를 개선하려는 시도도 최근에 이루어지고 있다(12). 하지만, 이러한 통합 치료에 이용되는 아데노바이러스는 E1B 유전자가 원상태로 그대로 보존되어 E1B 19kDa 단백질이 여러 항암제에 의해 유도되는 세포고사를 억제하여 항암 효과를 저해시킬 수 있다. 그러므로, E1B 19kDa 단백질의 기능이 선택적으로 소실된 증식 가능 아데노바이러스가 개발되어진다면, 아데노바이러스의 증식에 따른 세포괴사 뿐 아니라 세포고사를 동시에 유도할 수 있어 암세포 살상능이 배가될 수 있으며, 이는 또한 세포고사를 유도하는 여러 항암제와의 통합치료를 통해 항종양 효과를 더욱 개선시킬 수 있을 것이다.

아데노바이러스 E1B 유전자의 또 다른 단백질인 E1B55kDa는 p53과 결합하여 그 기능을 억제하여 아데노바이러스의 증식에 따른 감염세포의 살상을 유도한다(4). 이러한 p53의 불활성화를 유도하는 기능 외에도, E1B55-kDa은 아데노바이러스 mRNA의 세포질로의 이동 및 아데노바이러스의 구성 단백질의 합성을 촉진하며, 동시에 숙주세포의 mRNA의 세포질로의 이동이나 숙주세포의 단백질 합성을 저해한다(13,14). 따라서 E1B55kDa의 기능이 소실된 증식 가능 아데노바이러스는 아데노바이러스의 효과적인 복제에 필요한 E1B55kDa이 소실되어 암세포내에서의 바이러스 증식이 제한되게 일어날 수 밖에 없어 저하된 세포살상능을 나타내고 이로 인한 항종양 효과가 저하되는 것으로 추정된다.

아데노바이러스의 E1B 19kDa의 세포고사 억제제로서의 역할이나 E1B55kDa의 바이러스 복제에 관련된 기능들이 개별적으로 보고된 적은 있으나(9 11,13,14), 이들 E1B 유전자들의 여러 조합에 따른 아데노바이러스의 암세포 살상능 및 항암 효과의 체계적인 비교·분석은 아직 보고되고 있지 않다. 이에, 본 연구에서는 아데노바이러스의 초기 발현 유전자인 E1B의 구성 유전자들인 19kDa과 55kDa들을 여러 가지로 조합하여 이들에 의한 아데노바이러스의 생산능과 세포살상능을 체계적으로 비교·분석하고자 하였다. 즉, E1B 19kDa 단백질의 기능 상실에 의한 세포살상능의 증폭 가능성과 E1B55kDa 유전자의 존재 유·무에 의한 바이러스의 생산능과 세포살상능을 체계적으로 비교함으로서 증식 가능 재조합 아데노바이러스의 전체적인 효율성을 평가하고자 본 연구를 계획하였다.

대상 및 방법

1) 대상 세포주 및 세포 배양

실험에 사용된 세포주들은 인체 간암 세포주(SK-Hep1, Hep3B), 뇌암 세포주(U343, U-251N), 폐암 세포주(A549), 그리고 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1부위가 숙주유전체내에 내재되어 있는 293 세포주이며, 모두 ATCC (American Type Culture collection, Manassas, VA)에서 구입하였다. 모든 세포주들은 10%의 우태아혈청(GIBCO, Grand Island, NY)을 포함하는 DMEM 배양액으로 항생제 penicillin/streptomycin (GIBCO)을 첨가하여 5% CO_2의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다.

2) 재조합 아데노바이러스들의 제작, 바이러스 생산 및 역가 산출

아데노바이러스의 E1B 19kDa과 E1B55kDa 유전자가 결실된 재조합 아데노바이러스 셔틀벡터 pΔE1B 19/55를 제작하기 위해 먼저 E1A 유전자만을 포함시킬 수 있는 primer set를 제작해 아데노바이러스 E1 셔틀벡터인 pXC1 (Microbix, Ontario, Canada)을 주형 DNA로 하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였으며, sense primer로 5'-TTATTGGATCCTTTGTCTAGGGCCGCGGG-3'와 antisense primer로 5'-CCAGGATCCAGATCTCCCCATTTAA-CACGCCATGC-3'을 사용하였다. 생성된 PCR 산물을 BamHI으로 절단한 후 pCA14 BglII 부위에 cloning시켜 pΔE1B 19/55 플라즈미드를 제작하였다. E1B 19kDa 유전자의 염기서열 중 개시 코돈이 종료 코돈으로 치환된 pΔ

E1B19kDa 셔틀 벡터를 제작하기 위해서는, 먼저 pXC1을 XbaI과 BamHI 제한효소로 절단 시켜 얻어진 1.3 kb DNA 절편을 pSP72 클로닝벡터에 삽입시킨 후 sense primer로 5'-GTTACATCTGACCTCCTGTAGGCTAGCGAGTGTTTG GAAG-3'와 antisense primer로 5'-CTTCCAAACACTCG-CTAGCCTACAGGAGGTCAGATGTAAC-3'를 이용하여 site-directed mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA)를 시행하였다. 제조된 primer 내에는 E1B19kDa 유전자 개시 코돈을 종료 코돈으로 바꾸는 돌연변이가 유도되었으며 새로이 생성된 pSP72/pXC1/1.3kb/Δ19mt 플라즈미드는 sequencing을 통해 mutagenesis 여부를 확인하였다. 돌연변이 시킨 pSP72/pXC1/1.3kb/Δ19mt 플라즈미드를 XbaI과 BamHI으로 다시 절단하고 pXC1 내에 재 삽입시켜 pΔE1B19kDa 셔틀 벡터를 제작하였다. 그리고 E1B55kDa 유전자가 결실된 Ad-ΔE1B55kDa 제작은 본 연구팀에서 이미 보고한 바 있다(10). 제작된 각각의 셔틀벡터는 XmnI 제한효소로 절단된 뒤 BstBI 제한효소로 단일가닥이 된 아데노바이러스 vmdl324Bst (Swiss의 Fribourgh 대학의 Verca 박사로부터 얻음)와 함께 대장균 BJ5183에서 동시 형질 전환시켜 유전자 상동 재조합(homologous recombination)을 유도하였다 (Fig. 1)(15). 상동 재조합된 플라즈미드 DNA를 수득하여 HindIII 제한효소로 처리하여 E1B19kDa과 E1B55kDa 두 유전자 모두 결실된 Ad-pΔE1B와 E1B19kDa 유전자에 개시 코돈이 종결 코돈으로 치환된 Ad-pΔE1B19 생성물을 확인하였다. 각각의 재조합 아데노바이러스 플라즈미드를 PacI으로 절단한 뒤 293 세포주에 형질 전환하여 Ad-ΔE1B19/55와 Ad-ΔE1B19 재조합 아데노바이러스를 생산하였다. 대조군 바이러스인 증식 불능 아데노바이러스 Ad-ΔE1, 야생형 재조합 아데노바이러스 Ad-WT는 각각 pCA14, pXC1 (Microbix)을 셔틀벡터로 이용해 동일한 방법으로 제작하였다. 각각의 재조합 아데노바이러스는 293 세포주에서 증식시켜 limiting dilution 또는 plaque assay로 바이러스의 역가를 결정하였다(16).

3) 재조합 아데노바이러스들의 유전체 분리와 PCR 분석

간암 세포주인 Hep3B에 Ad-ΔE1, Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B19, Ad-ΔE1B55, 그리고 Ad-WT 아데노바이러스를 multiplicity of infection (MOI) 10으로 각각 감염시키고 48시간 후 genomic isolation kit (Qiagen, Santa Clarita, CA)로 바이러스 유전체(genome)를 회수하였다. 수득한 아데노바이러스 유전체를 주형으로 하고 E1A, E1B19kDa, 그리고 E1B55kDa 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set들을 이용하여 PCR을 수행한 뒤, 각각의 E1A, E1B19, E1B55kDa에 대한 PCR product들을 섞어서 하나의 electrophoresis well에 loading하여 전기영동하였다.

4) Immunoblotting 분석

뇌암 세포주 U343에 Ad-ΔE1, Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B19, Ad-ΔE1B55, 그리고 Ad-WT 바이러스를 각각 MOI 10으로 감염시키고 48시간 후 감염된 세포를 회수하여 lysis buffer (50 mM HEPES containing 0.15 M NaCl, 0.5% Nonidet P-40 and protease inhibitors: PMSF, TLCK and TPCK)로 세포를 해리시키고 SDS-PAGE (sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 전기영동을 시행

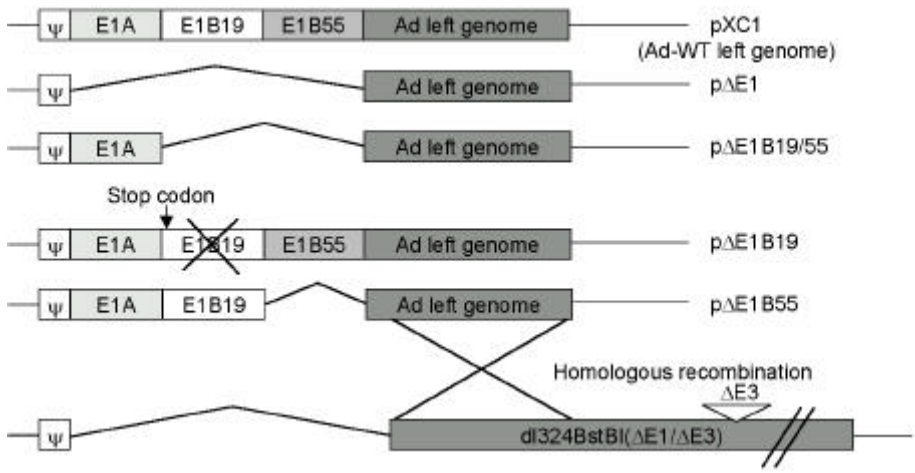

Fig. 1. Schematic representation of three E1B mutant adenoviruses, Ad-ΔE1B19, Ad-ΔE1B55, and Ad-ΔE1B19/55, along with Ad-ΔE1 and Ad-WT. Ad-ΔE1 is whole E1 region deleted; Ad-ΔE1B19 contains the normal E1A and E1B55kD, but is E1B19kD translation initiation codon mutated; Ad-ΔE1B55 contains the normal E1A and E1B19kD, but is E1B55kD deleted; Ad-ΔE1B19/55 contains E1A, but is E1B19kD and E1B55kD deleted.

하였다. 전기영동 후 gel에 있는 단백질들을 PVDF membrane에 electro-transfer한 뒤 E1A 단백질(sc-430; Stratagene, CA)과 E1B 19kDa 단백질(DP17; Oncogene, Uniondale, NY)을 특이적으로 인지하는 항체들을 각각 일차 항체로 hybridization 시키고 각 일차항체에 대한 이차항체를 다시 hybridization 시킨 후 ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK) 방법으로 X-선 필름에 감광시켜 mambrane 상의 단백질과 항체와의 결합여부를 조사하고 각 단백질의 발현양상을 확인하였다.

5) 재조합 아데노바이러스의 증식 및 세포살상능 검증

재조합 아데노바이러스의 암세포에 대한 세포 살상능력을 검증하기 위하여 인체 간암 세포주(SK-Hep1, Hep3B), 뇌암 세포주(U343, U-251N), 폐암 세포주(A549), 그리고 양성 대조군으로 아데노바이러스 E1부위가 숙주 유전체에 내재되어 있는 293 세포주를 MOI 10, 1, 0.1의 Ad-ΔE1, Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B19, Ad-ΔE1B55, 그리고 Ad-WT 재조합 아데노바이러스로 각각 감염시켰다. 다섯 종류의 바이러스 중 어느 한 바이러스가 0.1 MOI의 역가에서 감염세포를 완전히 사멸시킨 시점에 모든 배지를 제거하고 0.5% crystal violet (50% methanol)으로 잔존한 세포들을 고정시키고 염색한 후 분석하였다.

6) Plaque 크기에 따른 바이러스 증식능 비교

아데노바이러스 E1부위가 숙주 유전체에 내재되어있는 293 세포주, 간암 세포주 Hep3B, 그리고 뇌암 세포주 U343을 6well plate에 각각 70 90% confluency로 plating하고 Ad-ΔE1, Ad-ΔE1B19, 또는 Ad-WT 바이러스들을 1×10^2 pfu/ml의 농도로 2시간 동안 감염시킨 후 37°C의 2×DMEM (10%의 우태아 혈청)과 항생제 penicillin/streptomycin 포함)를 42°C의 1.4% agarose와 섞은 Agarose-DMEM 혼합액을 바이러스가 제거된 감염된 세포주위에 첨가하여 상온에서 고체화한 후 37°C, 5% CO_2 항온 배양기에서 배양하였다. 배양 후 약 10일 경에 plaque의 크기를 확인한 후 agarose overlay 위에 10% TCA (Trichloro acetic acid)를 1 ml 넣고 30분 동안 방치한 후 agarose overlay를 제거하고 0.5% crystal violet (50% methanol)으로 고정시키고 염색하였다.

7) 전자현미경을 통해 살펴본 바이러스의 증식

인체 간암 세포주 Hep3B를 75T flask에 90% confluency로 plating하고 Ad-ΔE1B19와 Ad-WT를 각각 10 MOI 씩 감염시켰다. 이틀 후 원심분리하여 감염된 세포들을 회수하여 2% glutaraldehyde에 2시간 고정한 뒤 0.1 M cacodylate-HCl (pH 7.4)에 용해시킨 1% OsO_4에 1시간 고정하였다. 표본을 에탄올로 탈수한 뒤 Epon에 포매하고 절편을 만들어 전자현미경으로 관찰하였다.

8) TUNEL 방법을 통한 세포내 고사(apoptosis) 관찰

A549 세포주(2×10^4 cell)를 chamber slide에 분주하고 각각의 바이러스를 10 MOI로 감염시키고 4일 후 배지를 제거한 뒤 ApopTag Kit (Intergen, Purchase, NY)을 이용해 TUNEL assay를 시행하고 diaminobenzidine (DAKO, Carpinteria, CA)을 첨가한다. 세포들이 갈색으로 변하는 것이 육안으로 확인되면 증류수로 3회 씻어내고 0.5% methyl green으로 10분간 염색한다. 다시 증류수로 3회 씻어낸 후 cover glass로 고정시켜 현미경으로 관찰하였다.

결 과

1) E1B 변이 재조합 아데노바이러스들의 유전자 구성과 단백질 발현 양상 조사

E1B 19kDa과 E1B55kDa 유전자가 서로 다르게 조합된 3개의 증식 가능 아데노바이러스 Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B19, 그리고 Ad-ΔE1B55를 제작한 후, 이들 재조합 아데노바이러스들의 유전체내 E1유전자의 구성을 확인하기 위해 E1A, E1B 19kDa, 그리고 E1B55kDa 유전자들에 대한 특정 primer set을 각각 이용하여 PCR을 수행하였으며, 이들 아데노바이러스에 의해 발현되는 E1 단백질의 발현 양상을 검증하기 위해 immunoblotting을 시행하였다. 먼저 간암 세포주인 Hep3B에 상기한 세 종류의 E1B 재조합 아데노바이러스들과 음성 대조군으로 Ad-ΔE1 그리고 양성 대조군으로 Ad-WT을 각각 MOI 10으로 감염시킨 후 세포로부터 바이러스 유전체를 회수해 그것을 주형 DNA로 하여 각각의 특이 primer로 PCR하여 증폭된 산물의 존재 여부와 크기를 분석하였다(Fig. 2A). 음성 대조군인 Ad-ΔE1로 감염된 세포에서는 어떠한 PCR 산물도 생성되지 않았으며, Ad-ΔE1B19/55의 경우는 E1B 19kDa과 E1B55kDa 유전자들이 소실되어 있어 E1A 특이 산물(479 bp)만이 생성되었다. Ad-ΔE1B55로 감염된 세포에서는E1A (479 bp)와 E1B19 (429 bp) 유전자에 대한 PCR 산물들이 생성되었지만, E1B55kDa 유전자의 소실로 E1B55kDa에 대한 특정 primer set에 의해서는 PCR 산물이 생성되지 않았음을 확인하였다. E1B 19kDa의 유전자는 존재하나 개시 코돈이 종결 코돈으로 치환 돌연변이된 Ad-ΔE1B19와 양성 대조군인 Ad-WT로 감염된 세포에서는 E1A (479 bp), E1B19 (429 bp), 그리고 E1B55 (338 bp)에 대한 특이 PCR 산물들이 모두 생성되었다(Fig. 2B).

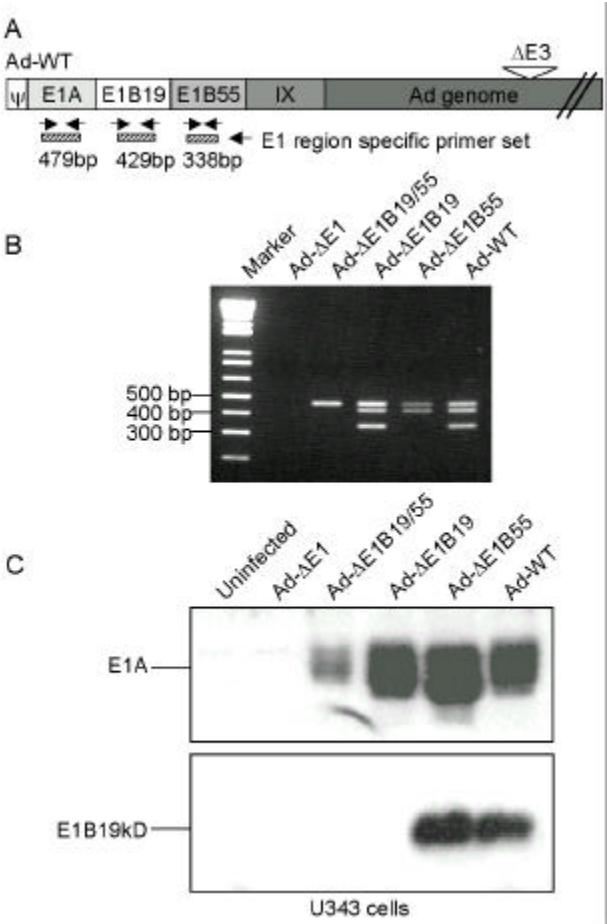

Fig. 2. (A) The E1 region specific primer sets corresponding to E1A, E1B19kD, and E1B55kD are shown below the diagram of E1 region of adenovirus genome. Each expected size of PCR products is 479 bp, 429 bp and 338 bp, respectively. (B) PCR product analysis of E1B mutant adenoviruses. Left, Marker (Life Technologies, Inc.), 1-kb DNA ladder. The presence of each PCR product verified the presence of the E1A, E1B19kD, or E1B55kD gene. (C) Detection of the E1A and E1B19kD protein by Western blot analysis. Twenty-four hours after infection, total protein from U343 cells infected with Ad-ΔE1, Ad-ΔE1B19, Ad-ΔE1B55, Ad-ΔE1B19/55, or Ad-WT at a dose of 10 MOI, were analyzed with anti-E1A or anti- E1B19 antibody as described in Materials and Methods.

이들 각각의 재조합 아데노바이러스의 유전자 구성을 단백질 수준에서 검증하기 위하여, 상기한 다섯 종류의 바이러스에 의해 각각 감염된 U343 뇌암 세포주로부터 모든 단백질들을 회수하여 E1A와 E1B19kDa 단백질들의 발현 양상을 immunoblotting을 시행하여 확인하였다(Fig. 2C). E1A 단백질은 E1 전체 부위가 소실된 음성대조군인 Ad-ΔE1을 제외한 4가지 종류의 아데노바이러스들에 의해 감염된 세포 모두에서 발현되었다. Ad-ΔE1B55와 Ad- WT에 의해 감염된 세포에서는 E1B19kDa 단백질이 발현되었으나, E1B19kDa 유전자가 소실된 Ad-ΔE1B19/55와 E1B19kDa 유전자의 개시코돈이 돌연변이 되어 있는 Ad-ΔE1B19로 감염된 세포에서는 E1B19kDa 단백질이 전혀 발현되지 않음을 확인 할 수 있었다. 또한 음성대조군인 Ad-ΔE1으로 감염된 세포에서도 E1B19kDa 단백질이 발현되지 않음을 관찰할 수 있었다. 이상과 같은 재조합 아데노바이러스들의 유전자 구성 및 이에 따른 단백질 발현 양상은 제작한 E1B 변이 재조합 아데노바이러스가 본 연구의 목적에 맞게 제작되었음을 의미한다.

2) 여러 종류의 암 세포에 대한 재조합 아데노바이러스들의 세포 살상능 검증

제작된 E1B 변이 재조합 아데노바이러스들인 Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B19, 그리고 Ad-ΔE1B55 의 암세포 살상능을 비교 검증하기 위하여, 대조군으로서 Ad-ΔE1과 Ad-WT을 함께 여러 종류의 암 세포주들을 감염시켜 세포 살상 정도를 관찰하였다. 사용된 인체 암 세포주들로서는 간암 세포주(SK-Hep1, Hep3B), 뇌암 세포주(U343, U251N), 그리도 폐암 세포주(A549)들이며, 이들을 각각 MOI 10, 1, 0.1의 역가로 상기한 다섯 종류의 아데노바이러스로 감염시켰다. Fig. 3에서 보듯이 음성 대조군인 복제불능 아데노바이러스, Ad-ΔE1으로 감염된 암세포들에서는 세포 살상효과가 관찰되지 않았으나, 대조군 세포주인 E1A 와 E1B 단백질이 발현되는 293 세포주에서는 다섯 종류 바이러스 모두가 유사한 살상효과를 나타내었다. 본 연구에 이용된 모든 종양 세포들에서, 투여된 바이러스의 역가로 비교할 때 Ad-ΔE1B19가 야생형 바이러스에 비해 약 5 10배 정도 높은 효율의 세포살상효과를 나타내었으며, 또한 Ad-ΔE1B19/55와 Ad-ΔE1B55에 비해서는 약 10-100배 이상의 높은 효율로 세포들을 사멸시키는 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이상과 같은 결과들은 본 연구에서 제작한 여러 E1B 변이 재조합 아데노바이러스들 중 Ad-ΔE1B19의 세포 살상능 및 세포살상 속도가 가장 우수하고 빨랐음을 의미한다.

3) Plaque 크기에 따른 재조합 아데노바이러스들의 세포살상능 비교

아데노바이러스의 증식과 세포살상, 그리고 주변세포로 바이러스가 퍼져나가는 것을 가시적으로 검증하기 위하여, 고체배지에서 아데노바이러스의 증식과 이에 따른 세포살상으로 형성되는 plaque의 진행속도를 관찰하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 복제에 필요한 E1 단백질이 제공되어지는 293 세포주에서는 각 바이러스들의 E1 유전

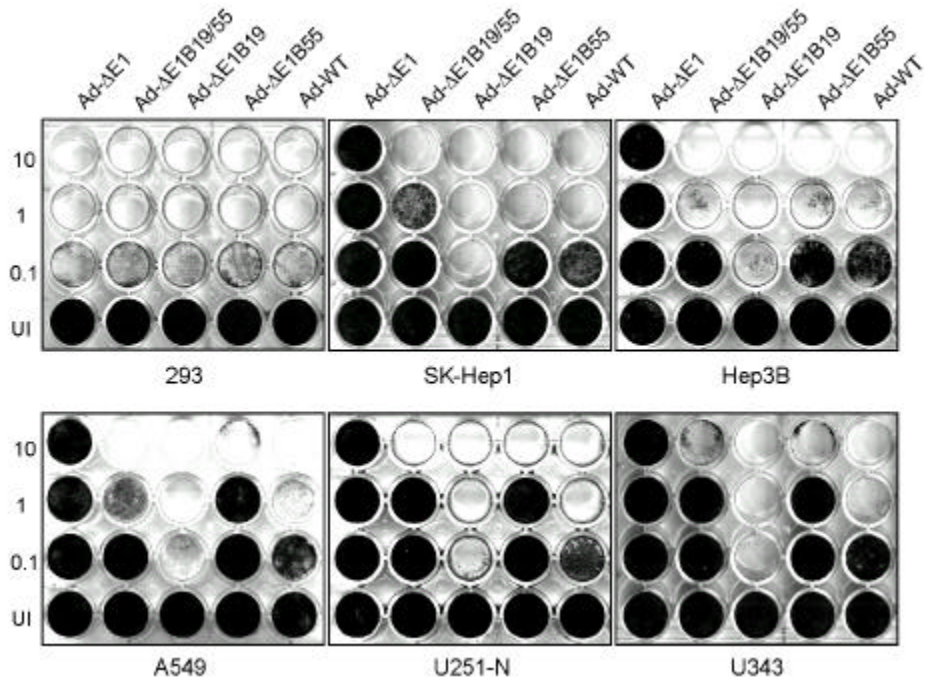

Fig. 3. CPE effects of replicating adenoviruses *in vitro*. Monolayers of cells were infected at an MOI of 0.1 to 10 with di adenoviruses, as indicated above the columns. Replication incompetent adenovirus Ad-ΔE1 and wild type aden Ad-WT served as controls. When cells infected with any kind of adenoviruses were completely lysed, cells rem on the plates were fixed and stained with crystal violet.

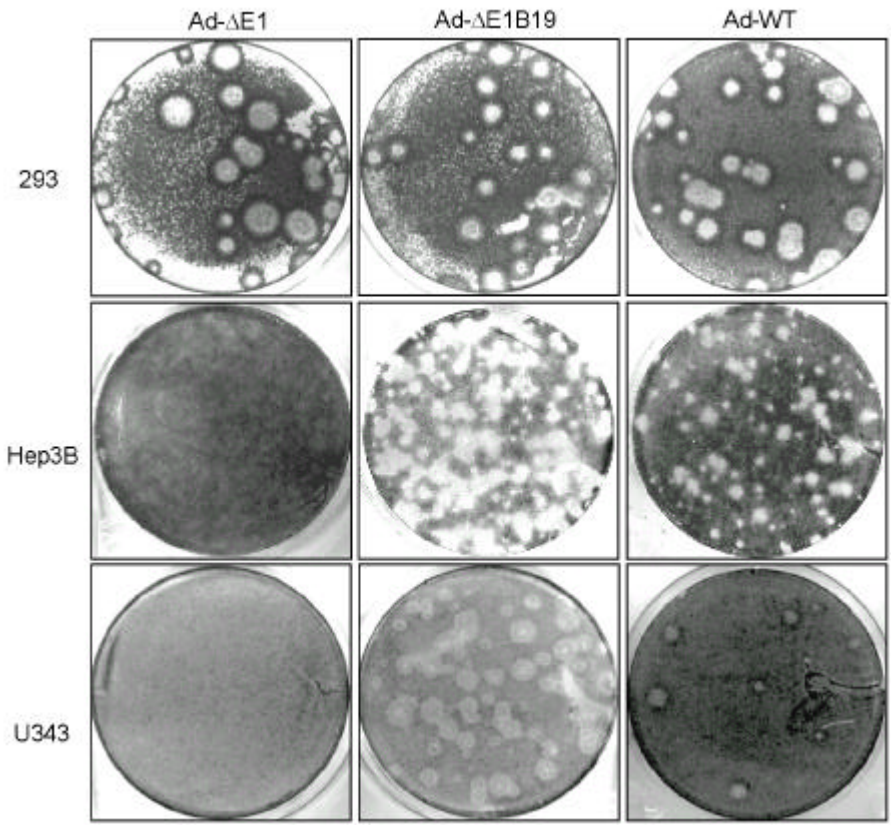

Fig. 4. Plaque morphology of Ad-ΔE1, Ad-ΔE1B19, and Ad-WT on 293, Hep3B, and U343 cells. After 4 hr adsorption period, plates were overlayed with agarose and incubated. At 10 days post infection, the agarose overlay was removed. Then, the cells were stained with crystal violet, and plates were photographed. Ad-ΔE1B19 lacking E1B 19kDa mutant adenovirus developed bigger plaques than Ad-WT. Non-replicating adenovirus Ad-ΔE1 did not develop any plaque except on E1 complementing cell line 293.

자의 구성과는 무관하게 Ad-ΔE1, Ad-ΔE1B19, 그리고 Ad-WT들이 모두 같은 크기의 plaque를 형성하였다. 그러나 Hep3B와 U343 암세포를 대상으로 감염시켰을 때에는 복제 불능 아데노바이러스인 Ad-ΔE1는 plaque을 전혀 형성하지 못하는 반면 Ad-ΔE1B19는 Ad-WT보다 크기가 현저하게 큰 plaque를 형성하였으며 같은 역가의 바이러스를 첨가하였음에도 보다 많은 개수의 plaque를 형성하였다. 그러나, Ad-ΔE1B19/55나 Ad-ΔE1B55로 감염된 Hep3B, U343 세포에서는 Ad-WT으로 형성된 plaque 보다 훨씬 더 작은 크기의 plaque들이 형성되었다(data not shown).

4) 재조합 아데노바이러스에 감염된 암세포의 전자현미경적 소견

Plaque의 광학 현미경 소견상에서, Ad-ΔE1B55 또는 Ad-WT 감염에 의해 사멸되어지는 세포들은 배양 플레이트 바닥으로부터 둥글게 형성되어져 떨어져 나가는 전형적인 아데노바이러스에 의한 세포사의 형태를 보였으나, Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-ΔE1B19로 감염된 세포들은 CPE 주변 세포들의 세포막이 찢겨진 형태로 사멸되어 가는 것이 관찰되었다(Fig. 5). 따라서, 이러한 다른 양상의 세포사를 보다 면밀히 관찰하기 위하여, Ad-ΔE1B19 또는 Ad-WT로 감염된 Hep3B 세포를 전자현미경으로 관찰하였다. Fig. 6에서 보는바와 같이 바이러스로 감염시키지 않은 Hep3B에서의 핵이나 세포 내 다른 소 기관들은 정상적인 모양을 갖추고 있었다. Ad-WT으로 감염된 세포의 경우도 세포 내 소 기관들이 정상적인 형태를 갖추고 있었으며, 핵 내에 고루 퍼져 있는 바이러스 입자들을 쉽게 관찰할 수 있었다. 그리고 세포막이나 핵막 역시 감염시키지 않은 세포처럼 잘 보존되어 있었으며 전반적으로 아데노바이러스 감염 시 나타나는 전형적인 세포 구조를 보였다(17). 반면 Ad-ΔE1B19로 감염된 세포는 세포 내 소 기관들의 형태를 구별하기 힘들었으며 세포막이나 핵막 또한 심하게 찢겨져 있는 괴사의 전형적인 모습이 관찰되기도 하였으나 염색질들이 덩어리지면서 핵막 쪽으로 심하게 밀리는 세포고사의 특징적 단면을 보여주고 있었다(18). 그러나 세포고사의 또 다른 특징인 세포막의 쭈그러짐 현상이나 세포 고사체들은 발견할 수 없었다. Ad-WT으로 감염된 세포에서도 염색질이 덩어리져 핵막 쪽으로 이동된 모습을 발견할 수 있었으나 아주 낮은 빈도였고 비정상적으로 핵이 비대해져 있음을 관찰할 수 있었으나 대부분의 염색질은 핵막 내에서 고루 퍼져 거의 정상적인 핵 모양을 보여주고 있었다.

5) TUNEL 분석을 통한 Ad-ΔE1B19에 의한 세포사 기작 검증

아데노바이러스 감염 후 E1A 단백질이 숙주세포 내에서 발현되면, p53이 활성화되어 세포성장 중지(G_0-G_1 arrest) 또는 세포고사(apoptosis)를 초래하게 되는데(19), 이때 아데노바이러스는 E1B19kDa 단백질을 발현하여 Bax와 Caspase 같은 세포고사를 직접, 또는 간접적으로 유도하는 단백질들과 결합하거나 이들 단백질들을 유도하는 기작을 방해해 세포고사를 억제하는 결과들이 보고된 바 있다(20). 본 연구에 사용된 복제 가능한 4종류의 바이러스들인 Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B19, Ad-ΔE1B55 그리고 Ad-WT이 실제로 E1B19kDa 단백질에 의존적으로 세포 내 고사를 억제하는지 알아보기 위해 세포고사의 특징인 DNA 절편화를 조사해 보았다. 각각의 증식 가능 아데노바이러스를 MOI 10으로 A549 폐암 세포주에 감염한 4일 후 TUNEL assay를 시행하여 세포 내 DNA 절편화를 관찰하였다. 이때, 세포고사 유도화학물질인 Camptothecin (CPT)을 1μM 처리한 A549 세포주를 양성 대조군으로 사용하였다. Ad-WT에 의해 감염된 경우는 약 5% 미만의 세포들

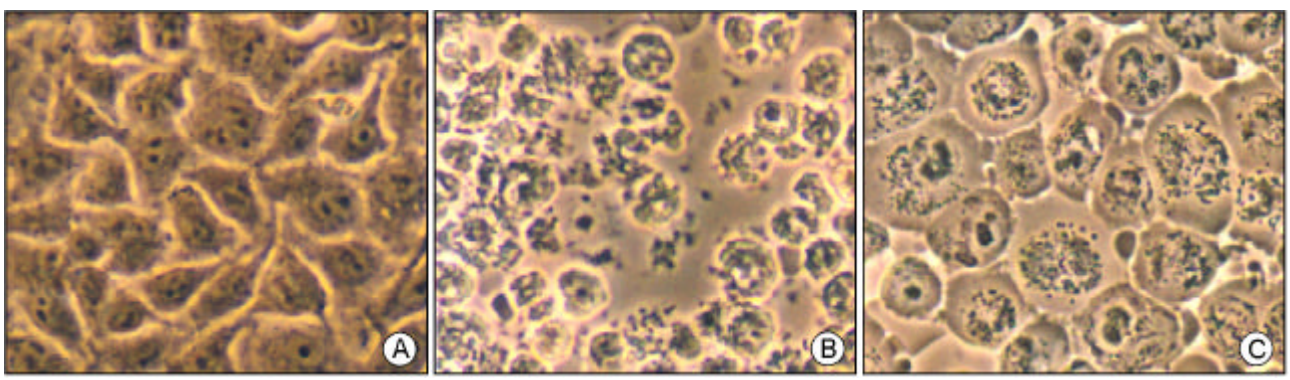

Fig. 5. Morphology of A549 cells infected with Ad-ΔE1 (A), Ad-ΔE1B19 (B), or Ad-WT (C). Infections were performed at an MOI of 10 as described in Materials and Methods. Micrographs of infected cells were taken at 4 days post infection.

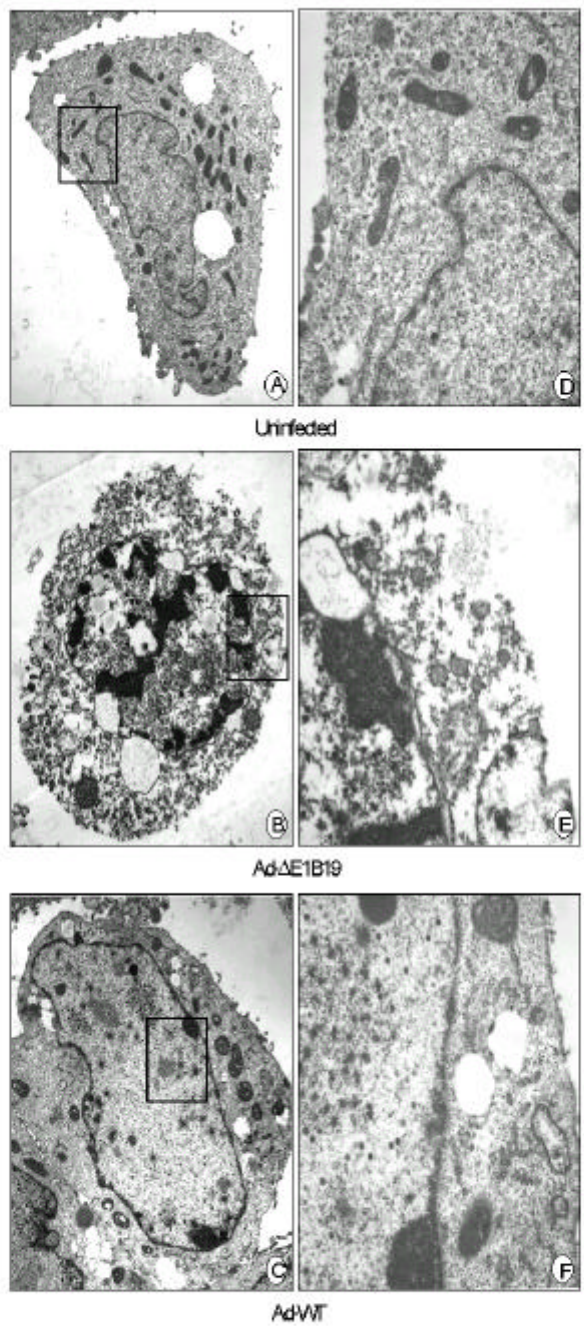

Fig. 6. Electron micrographs of uninfected (A, D) and infected Hep3B cells with Ad-ΔE1B19 (B, E) or Ad-WT (C, F) at 2 days post infection. Cells were infected at an MOI of 10 as described in Materials and Methods. Typical morphologies are shown. Original magnification were ×4,400 (A, B, C) and ×20,000 (D, E, F).

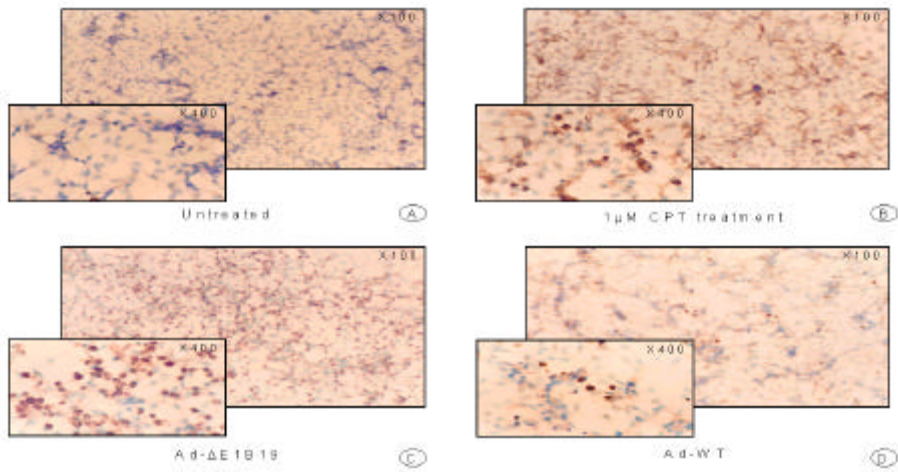

Fig. 7. TUNEL assay of A549 cells. At 4 days after treatment without (A) or with 1μM of camptothecin (B), or infection with Ad-ΔE1B19 (C) or Ad-WT (D) at an MOI of 10, apoptotic cells were detected by labeling with DAB (3,3'-diaminobenzidine) using terminal deoxynucleotidyl transferase (counter-stained with methyl green).

이 진한 갈색으로 염색된 반면, Ad-ΔE1B19의 경우는 70 80% 정도의 세포들이 진한 갈색으로 염색되어 E1B19kDa 단백질을 발현하는 Ad-WT에 의해 감염되었을 때 보다 훨씬 높은 빈도로 세포고사가 진행되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 7). Ad-ΔE1B19/55의 경우는 Ad-ΔE1B19보다는 낮은 빈도(30%)로 염색되었지만, Ad-WT과 Ad-ΔE1B55에 비해서 높은 빈도의 세포고사를 보여주었으며, Ad-ΔE1B55의 경우는 Ad-WT과 같이 거의 염색이 되지 않았다 (data not shown). 이로써 세포고사 억제제의 기능을 하는 것으로 알려진 Ad-E1B19kDa 단백질의 존재 유무에 따라 각 바이러스들에 의해 유도되어지는 세포사의 진행경로가 달라짐을 관찰할 수 있었으며, Ad- E1B19kDa 발현이 되지 않는 Ad-ΔE1B19가 암세포 내에서 자가 증식하여 암세포를 살상할 뿐만 아니라 세포고사를 함께 유도함으로써 보다 빠른 살상효과를 초래한다는 결과를 간접적으로 검증할 수 있었다.

고 찰

증식 가능 재조합 아데노바이러스가 새로운 암 유전자 치료법으로 대두된 이후 현재 이를 이용한 임상시험들이 활발히 진행되고 있다. 암세포 내에서 복제하여 주변으로 확산하여 그 치료효과가 도미노 현상과 같이 계속 퍼져나갈 수 있는 이점이 있는 증식 가능 아데노바이러스는 기존의 일세대 아데노바이러스인 증식 불능 아데노바이러스보다 유전자 전달효율이 우수하나, 야생형 아데노바이러스에 비해 암세포 살상력이 현격히 낮은 단점이 있다 (5 7). 최근에 이루어진 초기 임상시험에서 증식 가능 아데노바이러스가 인체에 안전하며 항종양 효과를 나타낸다는 것이 밝혀졌지만, 낮은 암세포 살상능으로 고농도의 아데노바이러스를 인체에 반복적으로 투여하여야 하고 기존의 다른 항암요법들과 함께 병용치료를 하여야 하는

제한점들이 대두되었다(21). 이러한 한계점들을 극복하기 위한 한 방안으로 본 연구에서는 아데노바이러스의 E1B 구성 유전자들인 E1B 19kDa와 E1B55kDa를 각기 다르게 조합한 E1B 변이 재조합 아데노바이러스들을 제작하여 세포 살상능을 체계적으로 비교 분석하였다.

아데노바이러스가 정상세포를 감염하면, 감염된 세포는 종양 억제 단백질인 p53을 활성화시켜 바이러스의 증식을 억제하는데 이때 E1B55kDa 단백질이 p53 단백질과 결합하여 그 기능을 억제하는 역할을 하며, 이에 따라 야생형 아데노바이러스는 활발하게 증식을 하여 궁극적으로 감염세포의 살상을 유도한다. 하지만 E1B55kDa 유전자가 소실된 재조합 아데노바이러스가 정상세포를 감염하면 이들 세포에 있는 p53의 비활성화를 유도할 수 없어 바이러스의 증식이 억제되지만, p53이 유전적으로 변형되어 있거나 기능이 억제되어 있는 여러 암세포들에서는 바이러스의 증식이 활발하게 일어나게 되어 궁극적으로 암세포 특이적 살상을 유도하게 된다(4 7). 이러한 사실들을 바탕으로 E1B55kDa 유전자의 기능이 소실된 재조합 아데노바이러스들이 항종양 아데노바이러스로 개발되기 시작하였으며, 본 연구실에서도 E1B55kDa 유전자가 소실된 YKL-1을 개발하여 암세포 특이적 증식 및 살상효과를 보고한 바 있다(6,7).

하지만, E1B55kDa 유전자가 부분 결실된 YKL-1 또는 dl1520 (ONYX-015) 재조합 아데노바이러스들은 p53 자체적 돌연변이나 결실, 또는 mdm2의 과다발현(22), HPV (Human Papiloma Virus) 등의 감염으로 인한 E6 단백질의 발현(23), 그리고 p14ARF의 돌연변이 등으로 종양억제 단백질인 p53이 비활성화된 암 세포주들에서 선택적인 항종양 효과를 보이긴 하나(24), E1B55kDa 단백질이 결실되어 있어 바이러스 mRNA의 핵막으로의 이동이나 부수적인 다른 기능들을 수행하지 못해 실제로 낮은 효율의 아데노바이러스 증식이 일어나 그 치료효과가 제한되고 있다. 즉, E1B55kDa는 아데노바이러스의 효과적인 복제에 필요한 유전자로서 이것이 소실된 재조합 아데노바이러스는 암세포 내에서의 바이러스 증식이 제한되게 일어날 수밖에 없어 이로 인한 항종양 효과가 감소될 수 있다. 본 연구팀에서 제작한 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 YKL-1 역시 개개의 종양세포에서 생산되는 바이러스의 역가가 야생형 아데노바이러스에 비해 낮았으며 결과적으로 세포 살상능이 야생형 아데노바이러스보다 현격히 감소되었다(6,7). 따라서, E1B55kDa 유전자의 소실은 암세포에 대한 특이적 살상능을 부여하는 큰 이점으로 작용하지만, 이로 인한 바이러스 복제능과 생산능이 저하되어 이에 따른 세포 살상능의 감소는 항종양 효과를 감소시키는 단점이 될 수 있다.

이러한 추론은 본 연구의 E1B55kDa이 소실된 두 개의 E1B 변이체인 Ad-ΔE1B19/55와 Ad-ΔE1B55들의 세포 살상능이 야생형 아데노바이러스인 Ad-WT과 E1B 19kDa의 기능이 특이적으로 상실된 Ad-ΔE1B19에 비해 현저히 낮았던 결과를 통해서도 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 암치료용 재조합 아데노바이러스의 효과적인 증식과 이에 따른 암세포살상을 유도하기 위해서는 E1B55kDa의 기능이 필요하다는 것을 의미한다.

증식 가능 아데노바이러스를 이용한 유전자치료의 효과적인 항종양 효과를 개선하기 위해서는 빠른 속도로 성장해 나가는 종양에 대해 보다 빠른 바이러스의 증식과 효과적인 살상효과를 유발시킴으로써 앞서 기술한 단점들을 극복할 수 있어야 한다. 본 연구의 세포 살상능을 검증하는 실험에서는 Ad-ΔE1B19가 다른 E1B 변이체들 보다 여러 인체 암 세포주들에서 훨씬 월등한 세포살상을 유도하였으며, 종양세포를 효율적으로 살상하는 빠른 증식과 주위 암 세포들로 효과적으로 확산되어나가는 사실을 검증하기 위한 plaque 형성 검증 실험에서도 주변세포로의 빠른 확산으로 야생형 아데노바이러스에 비해 더 크고 더 많은 개수의 plaque들을 형성하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 또한, 강력한 세포고사 억제제인 E1B 19kDa 단백질의 결손에 의한 세포고사가 증폭됨을 TUNEL assay를 통하여 검증하였으며, 전자 현미경을 이용한 세포형태 관찰에서도 Ad-ΔE1B19에 의해 감염된 세포들이 세포고사의 활성으로 야생형 아데노바이러스에 의해 감염된 경우보다 훨씬 빠른 속도로 살상되었으며 염색질이 덩어리져서 핵막 쪽으로 밀리는 것과 같은 세포고사의 특징을 부분적으로 볼 수 있었다. 이와 같은 결과들은 E1B 변이 아데노바이러스인 Ad-ΔE1B19가 바이러스의 증식에 의한 세포살상 뿐만 아니라 감염시 유도되는 E1A 단백질의 발현에 의한 세포내 고사를 활성화하여 배가된 세포살상효과를 나타내는 것을 의미한다.

결론적으로, 아데노바이러스의 E1B 19kDa 단백질이 결실된 Ad-ΔE1B19는 다른 여러 E1B 변이체 아데노바이러스들 보다 현격히 높은 세포살상효과를 나타내었으며, 이는 바이러스 증식에 관여된 E1B55kDa의 역할로 세포 내에서의 바이러스 증식이 활발히 일어나고 E1B 19kDa 단백질의 결실에 의한 세포고사를 함께 유도함으로서 보다 빠른 살상효과를 초래한다는 것을 의미한다. 즉, 바이러스의 증식에 관련된 E1B55kDa 유전자의 중요성을 본 연구를 통하여 알 수 있었다. 하지만 이는 또한, E1B55kDa 유전자가 증식 가능 아데노바이러스의 유전체에 재 도입되어 암세포 특이적 살상능이 결여되는 단점이 된다.

암세포에 대한 특이성의 부여는 E1B55kDa 유전자의 결실 외에도 다른 여러 가지 방법으로 이루어질 수 있는데, E1A 유전자의 Rb의 결합부위를 결실시켜 Rb 유전자가 변이된 암 세포 내에서의 특이적 증식을 유도하고 이에 따른 암세포 특이적 세포 살상능을 부여할 수 있다. 또한, 아데노바이러스의 복제에 필수적인 유전자인 E1A의 프로모터를 암세포 특이적 프로모터로 치환하여 암세포 특이적 증식과 살상능을 부여할 수 있고, 아데노바이러스의 파이버 부분을 변형시켜 암 세포막에 다량 발현되어 있는 특정 수용체를 통하여 감염이 가능하도록 하여 암세포 특이적 증식을 유도할 수 있다. 현재 본 연구실에서도 상기한 여러 가지 방법들에 의하여 Ad-ΔE1B19 바이러스에 암세포 특이적 살상능을 부여하려는 시도가 진행 중에 있다. 결과적으로, 암세포 특이성이 부여된 Ad-ΔE1B19 변이체 바이러스는 E1B19kDa 단백질의 결실에 의한 세포고사의 유도로 암세포 특이적 살상능이 증폭되어 임상에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

증식 가능 아데노바이러스에 의한 암세포 살상효과를 향상시키고 암조직 내의 바이러스 확산을 증가시키기 위하여 자살 유전자나 종양세포 살상을 유도하는 cytokine인 TNF 또는 paclitaxel이나 cisplatin과 같은 항암제를 함께 병용 치료하는 통합 치료법이 시도되고 있다(21). E1B55kDa 유전자가 소실된 증식 가능 아데노바이러스와 항암제를 병용하여 치료하는 통합 치료법이 초기의 임상시험에서 긍정적으로 보고되었으며, 현재 제 3상 임상시험이 시행되고 있다(25). 그러나, 기존의 증식 가능 아데노바이러스는 모두 세포고사 억제제인 E1B19kDa 단백질을 발현하여 여러 항암제에 의해 유도되는 세포고사를 억제하여 그 효과를 감소시키거나 오히려 역행할 수 있으며 이러한 가능성은 본 연구의 결과들로 확인되고 있다. 따라서, 기존에 많이 사용되어지는 항암제와의 통합 치료시 암세포 특이성이 부여된 Ad-ΔE1B19 변이체를 이용한다면 바이러스의 암세포 내 증식에 의한 세포살상 뿐 아니라 바이러스의 E1 단백질의 발현이나 투여한 항암제에 의해서 유도되어지는 세포고사를 더욱 촉진함으로써 보다 효과적인 항암효과를 유도할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 암세포 살상능이 향상된 아데노바이러스인 Ad-ΔE1B19 변이체는 임상에 이용할 경우 필요한 바이러스 투여량을 감소시켜 바이러스에 의한 독성과 인체내 면역반응을 최소화할 수 있는 이점도 제공할 수 있을 것이다.

결 론

본 연구에서 제작한 Ad-ΔE1B19 재조합 아데노바이러스는 바이러스 증식에 따른 세포괴사 뿐만 아니라 감염된 세포 내에서 세포고사를 함께 유발하여 여러 E1B 변이체 아데노바이러스들 중 가장 효율적으로 암세포를 살상시키고 주위 종양세포로 확산되어지는 효과 또한 탁월하므로 암 유전자 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Vile RG, Russel SJ, Lemoine NR. Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. Gene Ther 2000;7:2-8.
2. Runnebaum IB. Basics of cancer gene therapy. Anticancer Res 1997;17:2887-2890.
3. Graham FL. Covalently closed circles of human adenovirus DNA are infectious. EMBO J 1984;3(12):2917-2922.
4. Bischoff JR, Kirn. DH, Williams A, Heise. C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, and McCormick F. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. Science 1996;274:373-376.
5. Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, Arseneau, J, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Maples P, Romel L, Randlev B, Reid T, Kaye S, Kirn D. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kDa gene deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: A phase II trial. Cancer Research 2000;60:6359-6366.
6. Lee H, Kim J, Lee B, Lee Y, Chang JW, Ahn J, Park JO, Choi J, Yun CO, Kim BS, Kim JH. Oncolytic potential of E1B 55kDa-deleted YKL-1 recombinant adenovirus: Correlation with p53 functional status. Int J Cancer 2000;88:454-463.
7. Kim JS, Lee BY, Kim JA, Ahn JB, Park JO, Yu NC, Kim JH, Noh JK, Min JS, Kim BS, Lee HR. Evaluation of E1B-mutant replicating adenoviruses for cancer gene therapy. J Korean Cancer Assoc 2000;32(1):200-209.
8. Chiou SK, Tseng CC, Rao L, White E. Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. J Virol 1994;68(10):6553-6566.
9. Debbas M, White E. Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. Genes Dev 1993;7:546-554.
10. Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, White E. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. Genes Dev 1996;10:461-477.
11. Huang DC, Cory S, Strasser A. Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. Oncogene 1997;14:405-414.
12. Tsuruta Y, Mandai M, Konishi I, Kuroda H, Kusakari T, Yura Y, Hamid AA, Tamura I, Kariya M, Fujii S. Combination effect of adenovirus-mediated pro-apoptotic bax gene transfer with cisplatin or paclitaxel treatment in ovarian cancer cell lines. Eur J Cancer 2001;37:531-541.
13. Babiss LE, Ginsberg HS, Darnell JE Jr. Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. Mol Cell Biol 1985;5:2552-2558.
14. Pilder S, Moore M, Logan J, Shenk T. The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. Mol Cell Biol 1986;6:470-476.
15. Chartier C, Degryse E, Gantzer M, Dieterle A, Pavirani A,

Mehtali M. Efficient generation of recombination adenovirus vectors by homologous recombination in Escherichia coli. J Virol 1996;70:4805-4810.
16. Hitt M, Bett AJ, Prevec L, Graham FL. Construction and propagation of human adenovirus vectors. Cell biology: a laboratory handbook. New York: Academic Press Inc, 1994: 479-490.
17. Tollefson AE, Scaria, A Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ, Wold WSM. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. J Virol 1996; 70(4):2296-2306.
18. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significancer of apoptosis. Int Rev Cytol 1980;68:251-306.
19. Prives C, Hall PA. p53 pathway. J Pathology 1999;187: 112-126.
20. White E. Regulation of apoptosis by adenovirus E1A and E1B oncogenes. Semin Virol 1998;8:505-513.
21. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, Macdougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Bruso P, Kaye SB, Hong WK, Kirn DH. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. Nat Med 2000;6:879-885.
22. Marchetti A, Buttltta F, Pellegrini S, Merlo G, Chella A, Angeletti CA, Bevilacqua G. MDM2 gene amplification and overexpression in non-small cell lung carcinomas with accumulation of the p53 protein in the absence of p53 gene mutations. Dign Mol Pathol 1995;4:93-97.
23. Scheffner M, Warness BA, Huibrechtse JM, Levine AJ. The E6 oncoprotein encoded by human papilloma virus type 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell 1990;63: 1129-1136.
24. Ries SJ, Brandts CH, Chung AS, Biederer CH, Hann BC, Lipner EM, McCormick F, Korn WM. Loss of $p14^{ARF}$ in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015). Nat Med 2000;6(10):1128-1133.
25. Kirn D, Martuza RL, Zwiebel J. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. Nat Med 2001;7:781-787.